



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADEMICA DE MEDICINA HUMANA

Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la nistatina, estudio in vitro.

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO CIRUJANO

AUTORA:

TIPULA DEZA, MEYLÍN LLOSEANY

ASESOR

DRA. MARIA ACEVEDO ROJAS
DR. CARLOS ÁLVAREZ BAGLIETTO

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES

TRUJILLO – PERÚ
2016

PAGINA DEL JURADO

Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la nistatina, estudio in vitro.

.....
Jorge Luis Plasencia Cuba
Presidente del Jurado

.....
Marco Alfaro Angulo
SECRETARIO DEL JURADO

.....
Carlos Álvarez Baglietto
VOCAL DEL JURADO

FECHA DE SUSTENTACION Y APROBACIÓN:

15 / 12 / 2016
DIA MES AÑO

DEDICATORIA

A DIOS:

Por haber ayudado a lograr mis objetivos, y proyecto de vida, así como por su infinito amor.

A mi madre:

Por darme sus cuidados en cada instante, por su apoyo, su amor, por motivarme continuamente permitiéndome llegar a ser un mejor ser humano.

Meylín Lloseany Tipula Deza.

AGRADECIMIENTO

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi madre: por darme la vida, quererme mucho, confiar en mí y porque siempre me apoyaste. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

Mi hermana y abuela, por estar conmigo y darme su apoyo siempre, las quiero mucho.

Para aquellas personas, familiares y amigos que me han ayudado en este largo camino de aprendizaje.

Meylín Lloseany Tipula Deza.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Meylín Lloseany Tipula Deza con DNI 70258081, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada “Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la nistatina, estudio in vitro”, son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada-

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Trujillo 15 de Diciembre del 2016.

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

Presento ante Ustedes la Tesis titulada “Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la nistatina, estudio in vitro”, con la finalidad de evaluar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la Nistatina in vitro; en cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

Esperando cumplir con los requisitos de aprobación

Meylín Lloseany Tipula Deza

INDICE

PÁGINA DEL JURADO	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	v
PRESENTACION	vi
INDICE	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Problema de investigación.....	18
1.2 Hipótesis	18
1.3 Objetivos.....	18
II. MARCO METODOLOGICO	19
2.1 Variables	19
2.2 Operacionalización de variables:	19
2.3 Metodología.....	20
2.4 Tipo de estudio	20
2.5 Diseño.....	20
2.6 Población muestra y muestreo	21
2.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad..	22
2.8 Métodos de análisis de datos	24
III. RESULTADOS.....	25
IV. DISCUSIÓN	30
V. CONCLUSIÓN	33
VI. RECOMENDACIONES	34
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
VIII. ANEXOS.....	39

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la Nistatina in vitro. Se aplicó un estudio experimental con 32 placas Petri; 8 placas para nistatina y 24 para las 3 dosis de *Piper angustifolium*. Resultados: la nistatina a las 24 horas tuvo un halo de inhibición de 22.6 ± 1.1 mm. El Extracto hidroalcohólico de hojas *Piper angustifolium* al 12 % obtuvo un halo inhibitorio, de 25.8 ± 1.4 mm dentro de las 24 horas, y 11.9 ± 0.8 mm (resistente) a las 48 horas. En la concentración al 10% el halo inhibitorio fue 16.8 ± 1.3 mm a las 24 horas, y 8.6 ± 1.4 mm a las 48 horas. En las primeras 24 horas, existe similitud en el efecto antifúngico de la nistatina y la concentración al 12% del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium*, diferenciándose con el resto de concentraciones. Conclusiones: La dosis de nistatina de 300 microgramos y la dosis al 12% de extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* tienen efecto antifúngico en las primeras 24 horas, mientras que la dosis al 10% tiene un efecto intermedio, para el resto de concentraciones es resistente. Al comparar la dosis mínima inhibitoria antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* y la nistatina sobre las colonias de *Candida albicans*, solo ambos tienen el mismo efecto antifúngico en las primeras 24 horas.

PALABRAS CLAVE; antifúngico, extracto hidroalcohólico, *Piper angustifolium*, nistatina *Candida albicans*.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the antifungal effect of the hydroalcoholic extract of leaves of *Piper angustifolium* “matico” on strains of *Candida albicans* compared with in-vitro Nystatin. Applied an experimental study with 32 Petri dishes; 8 plates for Nystatin and 24 to the 3 doses of *Piper angustifolium*. Results: Nystatin 24 hours had a zone of inhibition of 22.6 ± 1.1 mm. Extract hydroalcoholic leaves *Piper angustifolium* 12% obtained an inhibitory halo, 25.8 ± 1.4 mm within 24 hours, and 11.9 ± 0.8 mm (resistant) to 48 hours. In the concentration to 10% inhibitory halo was 16.8 ± 1.3 mm at 24 hours, and 8.6 ± 1.4 mm at 48 hours. In the first 24 hours, there is similarity in the effect antifungal of Nystatin and concentration to 12% of the hydroalcoholic extract of leaves of *Piper angustifolium*, differing with the rest of concentrations. Conclusions: 300 micrograms Nystatin dose and the dose to 12% of hydroalcoholic extract of leaves of *Piper angustifolium* have antifungal effect in 24 hours, while the dose to 10% has an intermediate effect, for the rest of concentrations is resistant. The minimum inhibitory doses compared antifungal of the hydroalcoholic extract of leaves of *Piper angustifolium* and Nystatin over the colonies of *Candida albicans*, only both have the same effect antifungal in the first 24 hours.

KEY WORDS; antifungal, extract hydro-alcoholic, *Piper angustifolium*, Nystatin *Candida albicans*.

I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis es considerada como infección cosmopolita. Representa la infección oportunista más frecuente en seres humanos. Su incidencia ha aumentado de manera considerable en las últimas dos décadas. La *Candida albicans* es causante del 7,5% de micosis en total, el 25% de micosis de afección superficial, y del 75% - 88% de infecciones micóticas en nosocomios. La afección no distingue sexo, raza o grupo étnico.¹

La infección por candida es la cuarta en orden de frecuencia como causa de infección en el torrente sanguíneo dentro de los nosocomios en países como Estados Unidos y otros países desarrollados. La mortalidad atribuible a la candidiasis representa de 15%-25% en adultos y de 10%-15% en neonatos y niños. El gasto que se atribuye a cada episodio de infección invasiva por candida en pacientes hospitalizados es aproximadamente 40000 dólares americanos.²

En México la infección por *Candida albicans* es la causa más frecuente dentro de las consultas de ginecología; ocupando la segunda causa de vulvovaginitis secundaria a *Candida albicans* en mujeres de edad fértil. Los reportes, indican que un 75% de mujeres padecen de por lo menos un episodio de candidiasis vulvovaginal desde la menarquia hasta la menopausia.³

En el Perú no se encuentra datos sobre la incidencia de candidiasis vaginal, siendo la automedicación así como el sobrediagnóstico las principales razones de ello. La automedicación está presente en el 20% - 30% de mujeres, que presenta un diagnóstico verdadero de candidiasis. Las mujeres que tienen como comensales a candida intravaginal llegarían al 40%, quienes son asintomáticas.⁴

Hace dos décadas se iniciaron las publicaciones acerca de investigaciones sobre las bondades medicinales de las *Piperaceae* sp. En Italia se reportó un estudio sobre el efecto antimicrobiano y fúngico de derivados naturales de *Piper*

angustifolium, hallándose que estos extractos exhibieron actividades bacteriostáticas y fungistáticos contra la *Cándida albicans*.⁵ Por otro lado en Sudamérica específicamente en Brasil, investigadores encontraron la presencia de hidroquinonas preniladas y las flavononas naringenina y sakuranetina, siendo estos compuestos los que tuvieron actividades antifúngicas comparables a los productos químicos como la Nistatina y Miconazol.⁶ Además en el Perú también se realizó estudios sobre el efecto antifúngico del *Piper angustifolium*, obteniéndose que existía dicha actividad sobre cepas de *Candida albicans*, así como en algunas bacterias.⁷

Hoy, el número de investigaciones que incorporan la nistatina en otras formas farmacéuticas han ido en aumento, esto debido a su solubilidad. Sin embargo los antimicóticos constituyen fármacos de venta restringida, entre los que figura la nistatina usado para tratamiento de candidiasis.⁹ Por consiguiente el uso de la medicina natural representa una alternativa en el tratamiento de la candidiasis.

A continuación se describirá una serie de trabajos previos con el fin de comparar y analizar los resultados del presente trabajo de investigación:

Suwanmanee S, et al¹⁰ (Tailandia, 2014), investigaron las propiedades antifúngicas de extractos crudos de diez especies de plantas medicinales. Se extrajeron muestras de crudo mediante el proceso de extracción de agua caliente. Se determinaron la concentración inhibitoria mínima (MIC) y zona de diámetro de inhibición en cada extracto contra diez cepas fúngicas, y fluconazol fue utilizado como control positivo. AL usar la *Piper betel* sobre las cepas de *Candida albicans*, se halló que la concentración mínima inhibitoria fue 4 mm, la zona de inhibición 12 ± 1.02 mm y el porcentaje de inhibición fue $37.5\% + 1.02\%$, mientras que para el fármaco antifúngico fue 17 ± 1.14 mm, concluyéndose que el *Piper sp.* contiene un gran número de moléculas bioactivas, incluyendo los polifenoles, alcaloides, esteroides, saponinas y taninos que exhibieron citotoxicidad contra cepas fúngicas.

Ortega C, et al ¹¹ (Brasil, 2013), evaluaron la actividad antifúngica de extractos obtenidos de *Piper regnellii* con dióxido de carbono supercrítico contra levaduras y hongos filamentosos. El extracto más activo fue obtenido de las hojas extractos de *Piperecaceae* a 40° C, con una concentración inhibitoria mínima de 3,9 µg/mL contra *Candida albicans*. El eupomatenoid-3, eupomatenoid-5, 6-eupomatenoid y conocarpan estaban presentes en todos los extractos como principios activos con actividad antifúngica. Los resultados indican la posibilidad sobre el uso de extractos de *Piper regnellii* obtenido por la extracción, como posibles fuentes de compuestos bioactivos para uso en medicina.

Flores E, et al ¹² (Bolivia, 2010), evaluaron los extractos de diclorometano de 14 especies vegetales del género *Piper* sp. in vitro por su actividad antifúngica. Las especies con actividad interesante fueron *Piper aduncum*, *P. elongatum* Vahl, *P. acutifolium*, *P. Pilliraneum* C.DC y *P. hispidum*. Mediante estudios cromatográficos biodirigidos, se aislaron e identificaron compuestos responsables de la actividad antifúngica y leishmanicida de *P. aduncum* como 5,7- dihidroxiflavanona, 5,7-dihidroxi-4metoxi-flavanona, Acido 3-(3',7'-dimetil-3',6'-octadienil)-4-metoxi benzoico. De cada una de las 25 muestras vegetales se preparó el extracto orgánico y acuoso. Los extractos orgánicos fueron evaluados contra varias cepas de *Trichophyton*, *Microsporum* y *Cándida albicans* con el fin de obtener el perfil de la actividad antifúngica, hallándose que la *Piper angustifolium* en concentraciones de 2.5 mg/ml; tuvieron acción contra *Candida albicans*, de la misma manera se obtuvo el mismo resultado con concentraciones de 1.25 mg/ml y 0.62 mg/ml. Se halló efecto sobre *Candida albicans*.

Ruiz R. ⁸ (Perú, 2008) , evaluó la eficacia de los extractos etanólico y metanólico de las hojas de *Piper spp.* mostraron una actividad significativa contra las dos cepas de *Candida albicans* (CMI \leq 1000 µg/mL), se apreció que el 100 % de los extractos tiene un halo de inhibición \geq 18 mm, que se interpretado como actividad

significativa contra la *Candida albicans* ATCC 10231 mientras que el extracto hidroalcohólico tiene apenas actividad contra *Candida albicans* ATCC 10231 y es inactivo contra la *Candida albicans* cepa clínica. Por otro lado todos los extractos de *Piper lineatum* fueron activos contra las cepas de *Candida albicans* (CMI \leq 1000 $\mu\text{g/mL}$)

Huamaní M, et al ¹⁴ (Perú, 2005), investigó los extractos etanólicos de doce plantas como actividad antifúngica in vitro. Mediante un estudio experimental halló que el extracto etanólico de *Piper angustifolium* tuvo efecto antifúngico en cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, con halo inhibitorio de 19 mm + 1.2 mm y CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$, y halo inhibitorio de 17 mm contra cepas clínicas de *Candida albicans*; también se halló que otras especies de *piper sp* actúan como antifúngicos (*P. fulvescens*, , *P. rhispidum*, *P. crassinervium* Kunth, *P. tuberculatum* , *P. lanceaefolium* HBK, *P. angustifolium*, *P. guineense*, *P. coruscans* y *P. arboreum*,). El examen fitoquímico revela que tanto los taninos y compuestos fenólicos son los principales elementos que lo forman, a quienes se les indicaría como responsable de la actividad antifúngica. Dentro de ellos tenemos: hidroquinonas preniladas y sakuretina, con efecto comparable a nistatina y miconazol

Las candidiasis (candidosis, moniliasis, blastomicosis), se va producir en áreas de piel húmedas e intertriginosas, tanto de anexos cutáneos y mucosas, pero también podrían llegar a afectar otros órganos. Las levaduras tienen distribución cosmopolita, aislándose en personas asintomáticas, como parte de la flora en piel, mucosa respiratoria, mucosa digestiva y zonas intertriginosas. Afectando a diferentes grupos etáreos tanto en varones como mujeres. La frecuencia dependerá del cuadro clínico que se presente.¹⁵

En algunos países como México la incidencia de candidiasis en la población en general fue 267 x 100,000 habitantes, siendo las mujeres las más afectadas, conformando el grupo de mayor riesgo entre 20 y 24 años, mientras que en los varones el grupo con mayor incidencia es de 15 a 44 años.¹⁶

Dentro de los factores de riesgo tenemos: extremos de vida, gestación, menstruación, prematuros y lactantes. Hay factores locales como variaciones del pH e integridad de la epidermis; elementos mecánicos como aumento de temperatura, humedad, maceración, procesos traumáticos y quemaduras; Afecciones endocrino-metabólicas como diabetes mellitus, problemas tiroideos, enfermedad de Addison, enfermedad de Cushing y uremia; Factores nutricionales como la carencia de vitaminas, carencia de hierro, síndrome de malnutrición, y obesidad. También existen factores de riesgo como las enfermedades debilitantes; procesos sistémicos (acrodermatitis enteropática, síndrome de Down, enfermedades terminales); dermatosis anteriores (dermatitis del pañal, dermatitis de contacto, dermatitis seborreica); leucemias, linfomas cutáneos, procesos neoplásicos terminales, inmunodeficiencias congénitas y adquiridas; Drogas que deprimen el sistema inmune como citostáticos, antibióticos de amplio espectro, corticoides, iatrogénicas, radiaciones ionizantes, anovulatorios, sondas , catéteres y transmisión sexual¹⁷

El *Piper angustifolium* es una planta que se encuentra de forma silvestre en varios sitios del país, abarca tanto especies herbáceas y leñosas de áreas tropicales. El género *Piper* abarca aproximadamente 700 especies, económicamente resaltan las que dan la pimienta: *P. nigrum* (pimienta negra), *P. cubeba*, *P. officinarum*, *P. longum*. De ellos, la pimienta negra es un fruto completo, a comparación de la pimienta blanca que recién se obtiene al retirar el pericarpo. En nuestro país en el departamento de Amazonas se encuentran la mayoría de variedades del genero *Piper* encontrándose 210 especies, 2 subespecies, y 33 variedades que crecen entre 1500 msnm a 2 000 msnm, en bosques con neblina.¹⁸

La *Piper angustifolium*, es usado por menos del 5% de pobladores, esto podría ser explicado por falta de conocimiento o por desconfianza en productos naturales. Existe también uso en la elaboración de productos que usan como materia prima a esta planta, como en jaboncillos antisépticos. Existen diferentes nombres comunes los cuales son usados en diferentes partes del país: mata matico, cordoncillo, oreja de abad, hierba del soldado, matecllu y los shipibonibos, la llaman “potoima rao” (potoima quiere decir empacho y rao, remedio). Las hojas de matico son alternas, ovaladas con el ápex que termina en punta.¹⁹

La especie *Piper angustifolium* tuvo diversos usos; en la época pre-inca, lo usaban como hemostático y anti-inflamatorio. En la localidad de Huarica, ubicada en Cerro de Pasco, es usado como cicatrizante de heridas. Al cocer las 10 g/L de hojas, aplicando en las partes lesionadas, y tienen un uso contra las afecciones de vías urinarias.¹⁹

Se ha logrado aislar en el *Piper sp* diferentes compuestos como: esteroides, alcaloides, amidas, propenilfenoles, terpenos, neolignanos, lignanos, kawapironas, chalconas, piperolidos, hidrochalconas, flavonones, flavonas y entre otros. En *P. tuberculatum*, *P. hispidum* y *P. arboreum*, se logró aislar las amidas, piplartina, piperamina, piperina, arboreumina, 5,6-hidropiperlonguminina, fagaramida y en *P. crassinervium*, también se hallaron varias hidroquinonas preniladas y flavononas, todas con actividad antidermatofítica, también se obtuvo del extracto crudo de la hoja de la *Piper sp*, a las neolignanas eupomatenoides-3 y eupomatenoides-5 que mostraron gran actividad sobre *M. canis*, *T. rubrum*, *M. gypseum* y *T. mentagrophytes*. Estudios químicos en especies de la familia *Piperaceae* revelan la existencia de productos naturales fisiológicamente activos como amidas, alcaloides, dihidrochalconas, pironas, fenilpropanoides, flavonoides, neolignanos y lignanos. También amidas pirrolidina, dihidroxipiridona, piperidina y isobutílicas, fueron aisladas. Dichos

compuestos tienen gran interés por sus propiedades antidermatofíticas e insecticidas.²⁰

La nistatina es un polieno macrólido, que se usa como antifúngico de amplio espectro, al tener una gran toxicidad por vía sistémica queda restringido su uso a la vía tópica. La Nistatina es un miembro importante de un grupo relativamente grande y variado de antibióticos antifúngicos altamente insaturados que se logra aislar de cultivos de *Streptomyces noursei*. Por su estructura química y para diferenciarla de otros antibióticos con propiedades antifúngicas, se la incluye dentro del grupo denominado antibióticos antifúngicos de tipo poliénico. Este fármaco presenta tres formas polimórficas, denominadas Tipo A, Tipo B y Tipo C. Los polimorfos tipo A y B son los más comunes y pueden interconvertirse por efecto de condiciones ambientales.²¹

La nistatina se une de manera irreversible a los esteroides de la membrana presente en las especies de *Candida*. Las moléculas de polieno presentan mayor afinidad por los esteroides fúngicos, incluyendo el ergosterol que por los esteroides humanos, lo que permite una toxicidad relativa. Esta unión irreversible altera la permeabilidad de la membrana y posibilita la salida de componentes intracelulares esenciales y como consecuencia la muerte celular. En bajas concentraciones la nistatina es fungistática, mientras que en concentraciones más elevadas tiene actividad fungicida.²²

A continuación se describirán definiciones dentro del marco conceptual desarrollado en el presente trabajo:

Extracto hidroalcohólico.- Los extractos hidroalcohólicos se elaboran de alcohol puro de 96 grados y partes de una planta, el alcohol extrae las sustancias de las plantas. A este tipo de extracto de alcohol con agua, se le llama tintura.²²

Piper angustifolium Es una planta que crece como silvestre en muchos lugares del Perú, comprende especies leñosas y herbáceas de las regiones tropicales, conocida en el Perú con el nombre de “matico”.¹⁸

Efecto antifúngico es la capacidad que tiene toda sustancia para evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o micosis, incluso de provocar su muerte.²³

La infección por *Candida albicans* conocida también como Moniliasis, candidosis, es una enfermedad causada por levaduras que afectan principalmente la piel así como anexos cutáneos o mucosas, y de manera excepcional otros órganos.²³

Nistatina.- Es un polieno macrólido, antifúngico de amplio espectro, restringido en principio al uso tópico, debido a su toxicidad tras administración sistémica.²²

La escasez de estudios locales acerca del efecto antifúngico de una de las plantas de uso en la población como es el *Piper angustifolium*, ha motivado la realización del presente estudio. Además considerando la percepción que el tratamiento para la candidiasis tanto oral como vaginal no cubre las expectativas del paciente, ocasionando la búsqueda en la medicina alternativa.

Los fármacos disponibles actualmente, tiene una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando nuevos agentes antifúngicos más potentes pero sobretodo más seguros que los existentes actualmente. Se escogió estudiar al *Piper angustifolium* por ser una planta medicinal, con muchas propiedades medicinales, entre las que se incluye propiedades antidermatofíticas y antifúngicas. Esta última se comparará con otro producto químico denominado Nistatina cuyo uso antifúngico es ampliamente conocido.

Los resultados del trabajo contribuirá a la identificación de los efectos antifúngicos; pudiendo dar origen al aislamiento de principios activos, ensayos experimentales fito-farmacológicos, acción terapéutica en seres humanos, identificar mecanismos de acción a nivel molecular, de manera que se evalúe su uso como medicina alternativa promoviendo su industrialización.

1.1 Formulación Del Problema

¿En qué medida el extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “*matico*” tiene efecto antifúngico sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la Nistatina, in vitro?

1.2 Hipótesis

H0: El efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper angustifolium* sobre cepas de *Candida albicans* es menor comparada con la Nistatina in vitro.

H1: El efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper angustifolium* sobre cepas de *Candida albicans* es igual o mayor comparada con la Nistatina in vitro.

1.3 Objetivos:

1.3.1. GENERAL:

Evaluar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “*matico*” sobre cepas de *Candida albicans* comparada con la Nistatina in vitro.

1.3.2. ESPECÍFICOS:

1.3.2.1. Determinar el efecto antifúngico de la nistatina sobre las colonias de *Candida albicans* según días de experimentación a las 24, 48 y 72 horas de experimentación.

1.3.2.2. Determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* sobre las colonias de *Candida albicans*, a las 24, 48 y 72 horas de experimentación.

1.3.2.3. Comparar la dosis mínima inhibitoria antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* y nistatina sobre las colonias de *Candida albicans*, en 24, 48 y 72 horas.

II.- MARCO METODOLOGICO

2.1 Variables

Variable Independiente 1: Extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper angustifolium*

Variable Independiente 2: Nistatina

Variable Dependiente: Efecto antifúngico

2.2 Operacionalización De Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
VARIABLE INDEPENDIENTE extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper angustifolium</i>	sustancia obtenida por extracción de una parte de las hojas de <i>Piper angustifolium</i> , usando un solvente como etanol o agua. ^{10, 17}	Se considerará 10 gr de extracto hidroalcohólico como dosis estándar para el efecto antifúngico y se comparara con dosis de 8 y 12 gr.	1. 8 gr. 2. 10 gr. 3. 12. gr	Cualitativa Ordinal

VARIABLE INDEPENDIENTE Nistatina	Antifúngico perteneciente del grupo de los poliénicos, cuya estructura está formada por un grupo nitro (NO ₂) unido a un anillo heterocíclico. ¹¹	El disco tendrá 300 µg de nistatina.	1. Si 2. No	Cualitativa Nominal
VARIABLE DEPENDIENTE Efecto anti fúngico	Es el resultado de una acción con el fin de eliminar hongos. ¹⁷	Se tomará en cuenta el halo de diámetro de inhibición en mm.	1- resistente <14 mm, 2- Intermedio 15-17 mm 3- sensibles > 17mm.	Cuantitativa de razón

2.3. Metodología

Se aplicó el método Experimental

2.4. Tipo de Estudio

Aplicado prospectivo

2.5. Diseño De Investigación

Experimental con post prueba donde habrán 3 grupos el experimento y el control a los que se aplicará la sustancia antifúngica, los cuales se les asignará al azar.

G1	X1	01	02	03
G2	X2	01	02	03
G3	X3	01	02	03
G4	X4	01	02	03

Dónde:

X1=Extracto hidroalcohólico de *Piper Angustifolium* al 8%

X2=Extracto hidroalcohólico de *Piper Angustifolium* al 10%

X3=Extracto hidroalcohólico de *Piper Angustifolium* al 12%

X4= Nistatina

O= Mediciones a las 24hr, 48 hr y 72hr.

G= grupos

2.6. Población Y Muestra

Población:

Fueron 32 placas Petri con *Candida albicans*, siendo para cada grupo 8 cultivos de *Candida albicans*.

Unidad Muestral:

Cada placa Petri que contenga cultivo de *Candida albicans*

Unidad de análisis:

Cada cultivo de *Candida albicans*

Tamaño de muestra

Serán 32 placas (Anexo 1)

Criterios De Selección

Criterios De Inclusión

- Cultivos de *Candida albicans* de la misma cepa.
- Cultivos que tengan la misma cantidad y tamaño de la colonia de *Candida albicans*.

Criterios De Exclusión:

- Placa contaminada con otros hongos

2.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

Técnica: experimental

Procedimiento:

Recolección de la muestra: Las plantas de *Piper angustifolium*, fueron recolectadas en el Distrito San Benito, Provincia Contumazá, Región de Cajamarca, entre los 900 y 1400 msnm. La selección e identificación de las especies botánicas fue realizada por un Biólogo Jeyner Paredes Solórzano.

El microorganismo utilizado en el ensayo es la *Cándida albicans*, el cual fue proporcionado por el Instituto de Medicina tropical e Infectología de la UNT.

Las hojas de matico fueron recolectadas en San Benito y remitidas al Labortario Magnolab en Trujillo; ubicado en el porvenir Gran chimú N° 1867; en donde fueron acondicionadas y estabilizadas a temperatura ambiente y en sombra aproximadamente por una semana. Una vez estabilizada la muestra se sometió a un proceso de reducción de tamaño de partículas en un molino de cuchillas. Se utilizó el polvo de la hoja, en la proporción de 10 g de droga por cada 90 mL del solvente respectivo. La maceración fue a temperatura ambiental con una solución alcohol-hidrolizad (30:70). Los solventes se evaporaron mediante un rotavapor con temperatura por debajo de cuarenta grados centígrados. Para el bioensayo, dichos extractos fueron suspendidos con dimetil sulfóxido en concentraciones de 25 mg/mL. Esta situación estuvo basada en el proceso que inhibe la multiplicación del hongo, a través de la difusión de sustancias activas en un medio sólido y evidenciándose mediante la formación de halos claros en las colonias.²³

Para la preparación del inóculo se usó la *Candida albicans* ATCC 10231, cepa de carácter clínico, que se multiplican en agar dextrosa Sabouraud de 48 h para la *Candida albicans*. Se suspendieron los microorganismos en solución salina 0.85% estéril y se ajustó la turbidez al equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland para *Candida albicans* y por cámara cuenta-

células, hasta obtener el inóculo deseado (1×10^6 ufc/mL), corroborándose por sumatoria de diluciones en las cajas petri. El medio agar dextrosa de Sabouraud que previamente se reconstituyó, esterilizó, enfrió y mantuvo a cuarenta y cinco grados centígrados, fue inoculado con 1 mL de suspensión del inóculo (1×10^6 ufc/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, se homogenizó y distribuyó en las placas esterilizadas de 90 mm de diámetro, a razón de 20 mL por placa. Se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo testigo. Finalmente se hizo pozos con la ayuda de un sacabocado de acero de 11 mm de diámetro externo, en cada placa se harán 2 ó 3 pozos equidistantes.⁷

Adición de las muestras e incubación de las placas

Se agregó 100 μ L de los respectivos extractos (25 mg/mL) de las diferentes muestras en los pozos, se dejó reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y se llevó la incubación a 37°C por 24 h para *Candida albicans*. Para el ensayo se usaron como controles positivos nistatina (0,2 mg/mL) disueltos en DMSO (Dimetilsulfóxido) y agua respectivamente. Para leer e interpretar los resultados se visualizaron las regiones claras de inhibición del crecimiento (halos) y se midieron los diámetros en mm. Se consideró que tiene una actividad antifúngica significativa a un halo de inhibición mayor a 17 mm. Los extractos con actividad significativa fueron sometidos a la prueba de microdilución en placa para determinar su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) cuantitativa de las muestras y controles para determinar la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento del hongo siguiendo los protocolos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). Para las pruebas con *Cándida albicans* se usó el protocolo M27-A2.⁷

En la prueba de microdilución una solución de los extractos brutos diluidos en DMSO a concentración de 100 mg/mL fueron preparadas en diluciones dobles seriadas, adaptando el esquema de diluciones de drogas insolubles

en agua de los protocolos CLSI M27-A2 y CLSI M44-A⁸; obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales, que estuvieron en el rango de 7,8 – 4000 µg/mL del extracto trabajado. La concentración final de DMSO fue igual o inferior al 5% (v/v) para preparar los controles para las pruebas de microdilución, se usó la nistatina (soluble en agua) se prepararon 640 µg/mL, siguiendo las normas, 10 veces la mayor concentración a ser probada, en este caso 64 µg/mL. La concentración de los controles fue 0,125 – 64 µg/mL para nistatina.²³

La validación de la ficha de recolección de datos se realizó mediante la opinión de expertos, integrada por tres médicos, quienes manifestaron la pertinencia del instrumento.

No fue necesario aplicar prueba alguna que mida la confiabilidad, por cuanto es un extracto de datos puntuales que midieron las variables de estudio y fueron obtenidas de la experimentación.

2.8. Métodos De Análisis De Datos

El análisis estadístico se realizó en dos niveles: Descriptivo e Inferencial.

Análisis Descriptivo:

Se utilizaron medidas de tendencia central como promedio, así mismo medidas de dispersión como desviación estándar

Análisis ligados a la hipótesis o Inferencial:

Para comprobar nuestra hipótesis de estudio, se aplicó el análisis ANOVA para comparar promedios.

III. RESULTADO

TABLA N° 1: EFECTO ANTIFÚNGICO DE LA NISTATINA SOBRE LAS COLONIAS DE *CANDIDA ALBICANS* SEGÚN DIAS DE EXPERIMENTACIÓN. A LAS 24, 48 Y 72 HORAS DE EXPERIMENTACIÓN

ANTIFUNGICO	24 horas	48 horas	72 horas
NISTATINA	26.6 + 1.1 mm	8.7 + 0.8 mm	8.1 + 0.9 mm

FUENTE: Ficha de recolección de datos

El efecto antifúngico de la nistatina en las primeras 24 horas se mantiene, al hallarse que el halo de inhibición de 26.6 ± 1.1 mm. A las 48 horas el halo fue menor con $8.7 + 0.8$ mm y a las 72 horas fue $8.1 + 0.9$ mm, estas últimas mediciones indican resistencia antifúngica.

TABLA N° 2: EL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DEL *PIPER ANGUSTIFOLIUM* SOBRE
LAS COLONIAS DE *CANDIDA ALBICANS*, A LAS 24, 48 Y 72 HORAS DE
EXPERIMENTACIÓN

Extracto hidroalcohólico de hojas <i>Piper angustifolium</i>	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
8%	9.1 + 1.2 mm	8.3 + 0.7 mm	7.7 + 0.9 mm
10%	16.8 + 1.3 mm	8.6 + 1.4 mm	8.1 + 1.4 mm
12%	25.8 + 1.4 mm	11.9 + 0.8 mm	9.4 + 1.2 mm

FUENTE: Ficha de recolección de datos

A la concentración del 12 %, hay un mayor efecto sobre el halo inhibitorio, considerándose como sensible, dicho halo es de 25.8 + 1.4 mm en las primeras 24 horas, 11.9 + 0.8 mm (resistente) a las 48 horas y 9.4 + 1.2 mm a las 72 horas. En las concentraciones al 10%, su efecto fue intermedio con halo inhibitorio de 16.8 + 1.3 mm a las primeras 24 horas, 8.6 + 1.4 mm a las 48 horas y 8.1 + 1.4 mm a las 72 horas, considerada resistente las dos últimas. En concentración al 8%. en las primeras 24 horas se obtuvo un halo inhibitorio de 9.1 + 1.2 mm siendo resistente, situación que se repite en las próximas 48 con 8.3 + 0.7 mm y a las 72 horas 7.7 + 0.9 mm.

TABLA N° 3.COMPARACIÓN DEL HALO INHIBITORIO ANTIFÚNGICO DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DEL PIPER
ANGUSTIFOLIUM Y LA NISTATINA SOBRE LAS COLONIAS DE CANDIDA
ALBICANS EN LAS PRIMERAS 24 HORAS.

EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS PIPER ANGUSTIFOLIUM	NISTATINA		
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
8%	p=0.00	p=0.51	p=0.52
10%	p=0.00	p=0.99	p=0.99
12%	p=0.055	p=0.00	p=0.00

FUENTE: Ficha de recolección de datos

En las primeras 24 horas, existe similitud en el efecto entre la nistatina (300 microgramos) y la dosis del extracto al 12% del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* diferenciándose con el resto de concentraciones del extracto (p=0.055).

A las 48 horas, el extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* a dosis al 12%, tiene un mejor efecto en comparación con las otras concentraciones del mismo extracto, así como con la nistatina.(p=0.00).

A las 72 horas, el extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* a dosis al 12%, mantiene un mayor diámetro del halo inhibitorio en comparación con el resto de concentraciones del mismo extracto o la nistatina. (p=0.00), donde el resto de concentraciones de estas medidas no tiene efecto antifúngico.

GRAFICO N° 1 COMPARACIÓN DEL HALO INHIBITORIO ANTIFÚNGICO DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DEL PIPER ANGUSTIFOLIUM Y
LA NISTATINA A LAS 24 HORAS,

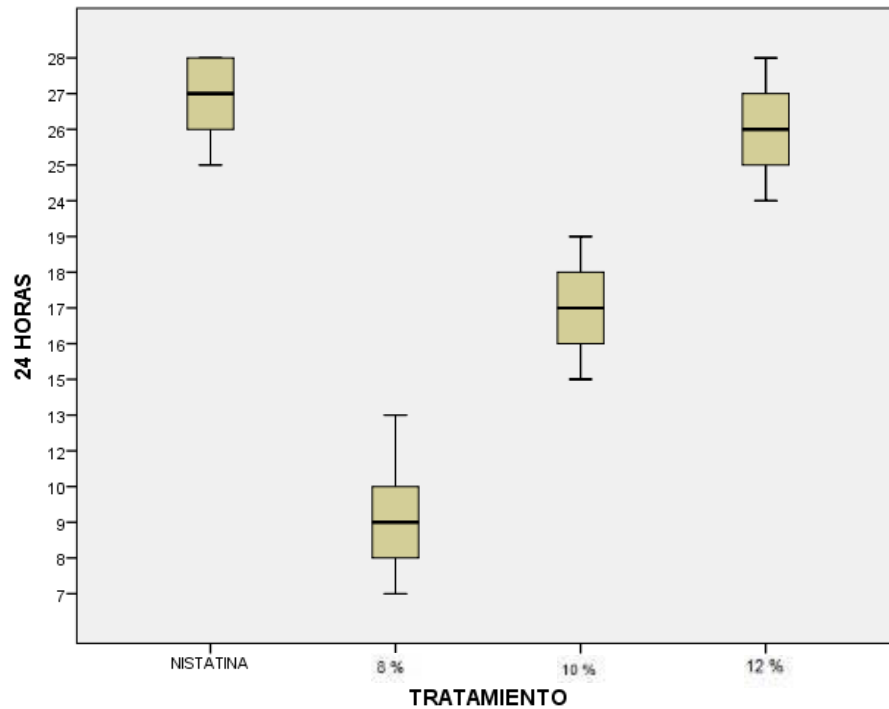


GRAFICO N° 2 COMPARACIÓN DEL HALO INHIBITORIO ANTIFÚNGICO DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DEL PIPER ANGUSTIFOLIUM Y
A NISTATINA A LAS 48 HORAS

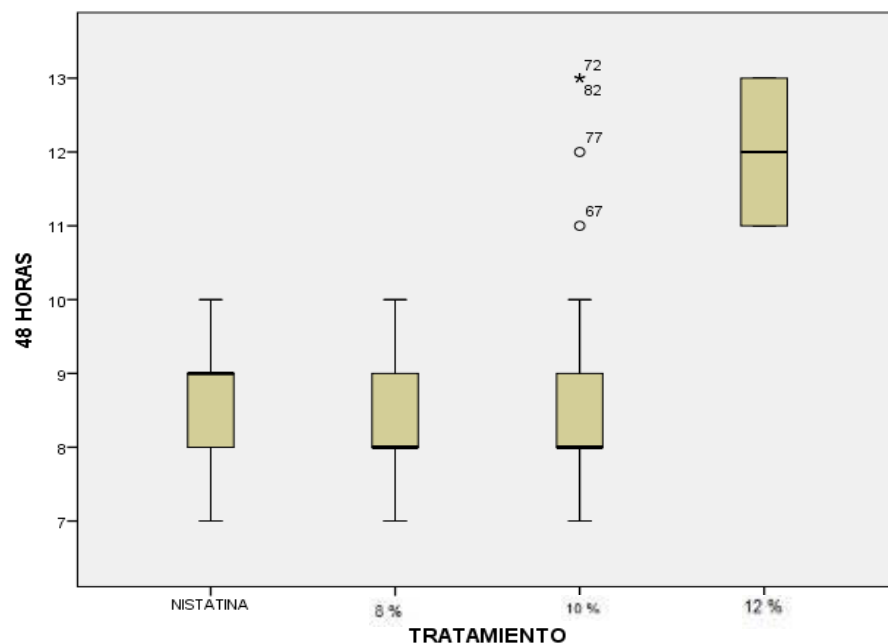
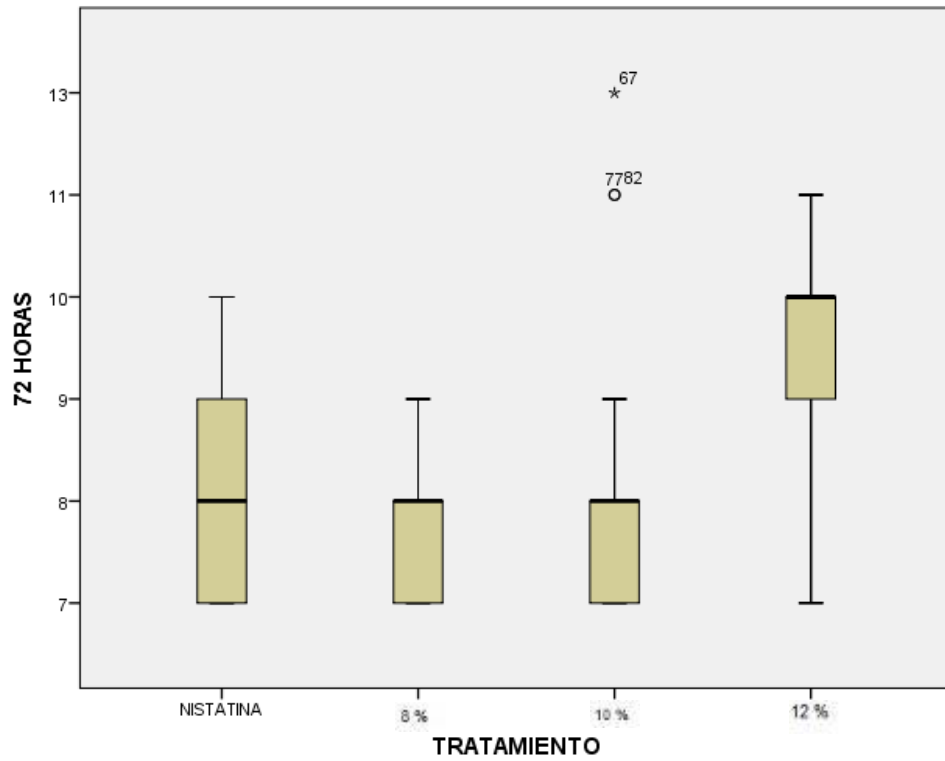


GRAFICO N° 3 COMPARACIÓN DEL HALO INHIBITORIO ANTIFÚNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DEL PIPER ANGUSTIFOLIUM Y LA NISTATINA A LAS 72HORAS.



IV.- DISCUSIÓN

En la Tabla 1.1 se aprecia que el efecto antifúngico de la nistatina observándose que solo en las primeras 24 horas mantiene dicho efecto, al hallarse que el halo de inhibición de 26.6 ± 1.1 mm, considerándose sensible en las primeras 24 horas, en las posteriores mediciones el halo fue menor con 8.7 ± 0.8 mm a las 48 horas, siendo de 8.1 ± 0.9 mm en las 72 horas, estas últimas mediciones indican resistencia antifúngica.

Ya estudios previos señalan el efecto antifúngico de la nistatina en el tratamiento de la candidiasis, considerando efecto terapéutico tópico en comparación con otros productos⁹ es necesario recordar que la nistatina en bajas concentraciones tiene acción fungistática, mientras que en concentraciones más elevadas tiene actividad fungicida, como el utilizado en el presente estudio que fue de 300 microgramos. Además la nistatina tiene solo utilidad tópica debido a que por vía parenteral presenta muchos efectos secundarios.²²

En la Tabla 2 se analiza el efecto que tiene el Extracto hidroalcohólico de hojas *Piper angustifolium* encontrándose que a una concentración del 12 %, se obtiene un mayor efecto sobre el halo inhibitorio, considerándose como sensible, obteniéndose un halo de 25.8 ± 1.4 mm dentro de las primeras 24 horas, la misma que desciende a 11.9 ± 0.8 mm (resistente) a las 48 horas y 9.4 ± 1.2 mm a las 72 horas. En el caso de las concentraciones al 10%, su efecto es intermedio con un halo inhibitorio de 16.8 ± 1.3 mm a las primeras 24 horas, para posteriormente a las 48 horas tener un halo de 8.6 ± 1.4 mm y posteriormente a las 72 horas el halo fue de 8.1 ± 1.4 mm considerado las dos últimas como resistente. En cuanto a la concentración al 8%.se aprecia que en las primeras 24 horas se obtuvo un halo inhibitorio de 9.1 ± 1.2 mm considerado como resistente, situación que se repite en las próximas 48 con 8.3 ± 0.7 mm y a las 72 horas 7.7 ± 0.9 mm.

Es importante señalar que el presente estudio se basa en extractos hidroalcohólicos, no encontrándose estudio que utilizaron dicho compuesto es que se va a comparar con otros preparados parecidos, en los cuales hubo resultados similares. Uno de éstos estudios fue el de Huamaní M, et al ¹⁴ (Perú, 2005) quien al utilizar el extracto etanólico de las hojas de *Piper angustifolium* “matico” mostró actividad contra *Candida albicans* ATCC 10231, con un halo de inhibición de 19 mm + 1.2 mm y una CMI de 500µg/mL. Incluso Flores E, et al ¹² (Bolivia, 2010), demostró el efecto antifúngico de los extractos de diclorometano de *Piper sp.* in vitro. Finalmente Ruiz R. ⁸ (Perú, 2008) , evaluó la eficacia de los extractos etanólico y metanólico de las hojas de *Piper spp.* Demostrando una actividad significativa contra las cepas de *Candida albicans*.

Sin embargo la presente investigación contradice lo reportado Ruiz R. ⁸ (Perú, 2008), quien señalo que el extracto hidroalcohólico tiene apenas actividad contra *Candida albicans* ATCC 10231 y es inactivo contra la *Candida albicans* cepa clínica. Probablemente la dosis o concentración fue insuficiente, como lo demostrado en el presente trabajo, donde concentraciones al a los efectores de salud 8 y 10%, muestra poca o ninguna actividad antifúngica, mientras que concentración al 12% confirman el efecto anticandidiasico.

El análisis fotoquímico del *Piper angustifolium*, al igual que el resto de sus variedades revelan ue los taninos, así como los compuestos fenólicos tiene una actividad contra la Cándida Albicans, incluyendo a otros compuestos como la hidroquinonas preniladas y sakuretina, con actividades comparables a la nistatina, que fue utilizado en la presente investigación.¹⁴

En la Tabla 3 se compara las diferencias del efecto de las dosis inhibitorias de la nistatina con las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* sobre las colonias de *Candida albicans*. Observándose que en las primeras 24 horas, existe similitud entre la nistatina y la dosis de 12% del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium*, diferenciándose con

el resto de concentraciones del extracto. Interpretándose que existe el mismo efecto antifúngico entre la nistatina (300 microgramos) y la dosis del extracto al 12%.

Estos resultados nos indica que dentro de las primeras 24 horas el efectos del extracto al 12% como la nistatina usada en este estudio tiene efectos similares contra la *Candida albicans*, por lo tanto ambos son útiles en el tratamiento, esto considerando el halo inhibitorio.

En la misma Tabla 3 se aprecia que el efecto antifúngico medido a las 48 horas, encontrándose que extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* a dosis al 12%, tiene un mejor efecto en comparación con las otras concentraciones del mismo extracto, así como con la nistatina.($p=0.00$), interpretándose que la dosis al 12%; tiene un mejor efecto antifúngico, que el resto de concentraciones, incluida la nistatina. Se observa que el efecto antifúngico, sea cual fuese la concentración, no permanece más allá de las 24 horas

Finalmente en la Tabla 3 se observa el efecto antifúngico medido a las 72 horas, donde extracto el hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* a dosis al 12%, mantiene un mayor diámetro del halo inhibitorio en comparación con el resto de concentraciones del mismo extracto o la nistatina.($p=0.00$), sin embargo, ninguno de estas medidas tiene efecto antifúngico, porque todos los resultados indican resistencia farmacológica.

Este resultado solo confirma que el efecto antifúngico solo es de 24 horas, en ambos productos, teniendo en consideración sus concentraciones por lo tanto se debe administrar dosis continuas con un máximo de tiempo de 24 horas

En el Gráfico 1, 2 y 3 se visualiza a través de los gráficos de cajones las diferencias entre los halos inhibitorios antifúngicos del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* a las 24, 48 y 72 horas respectivamente.

V. CONCLUSIONES

1. La dosis de nistatina de 300 microgramos tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* en las primeras 24 horas
2. La dosis al 12% de extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* tiene efecto antifúngico en las primeras 24 horas, mientras que la dosis al 10% tiene un efecto intermedio, el resto de concentraciones no tiene dicho efecto antifúngico.
3. El extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* al 12% y la nistatina, tienen el mismo efecto antifúngico sobre las colonias de *Candida albicans* en las primeras 24 horas.

VI.- RECOMENDACIONES

Recomendar los resultados del presente estudio, informando sobre las bondades que tiene el extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* en comparación con la nistatina, a los efectores de salud de manera que se considere como alternativa terapéutica.

Difundir los resultados en los productores de hojas de *Piper angustifolium*, como a personas interesadas en industrializarlas dentro de la medicina alternativa, ya que los resultados indican que la dosis de 12 gramos del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* son útiles para el tratamiento.

Realizar un estudio de costos, que permita evaluar su comercialización a mayor escala, por cuanto un producto natural tiene mayor aceptación en los pacientes.

VII. REFERENCIAS

1. Biasoli M. Candidiasis. Madrid Centro De referencia dermatológica. 2013. 8Citado 13 de Abril del 2015). Disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf
2. Pappas P, Kauffman C, Calandra T, Edwards J, Filler S, Fisher J, et al. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America CID 2009; 48 (1-3):T1-35 (Citado 29 de Juliodel 2015) Disponible en: http://cid.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/08/14/596757.DC1/CID_2009_48_503-535_2.pdf
3. Sánchez J, Rivera J, Coyotécatl L, Mendoza E. Incidencia de *Candida albicans* en pacientes estudiadas en la Ciudad de Puebla, México Acta Cient Estud 2009. (Citado 28 de Julio del 2015) Disponible en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=222&IDARTICULO=30032&IDPUBLICACION=3257>
4. Muñoz E, Angulo I, Chávez M, Luján M, Wilson J, Alayo G. Aislamiento de *Candida albicans* de mujeres con candidiasis vaginal atendidas en el Hospital Regional Docente de Trujillo-Perú, 2012. Enero-Junio, 2012;32(1):44-103 (Citado 24 de Julio del 2015). Disponible en: http://www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=112&Itemid=149.
5. Tirillini B, Velasquez E, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. Planta Med. 1996; 62(4):372-373. (Citado 18 de Abril del 2015 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8792674>)
6. Danelutte AP, Lago JH, Young MC, Kato MJ Antifungal flavonones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervum* Kunth. Phytochemistry. 2003; 64: 555-559 (Citado 20 de Abril del 2015). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942203002991>

7. Ruiz R. Actividad Antifúngica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales (TESIS Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 2008. Disponible en http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2590/1/Ruiz_qj.pdf
8. Ciudad A. Infecciones vaginales por *Candida*: diagnóstico y tratamiento Rev Per Ginecol Obstet. 2007;53:159-166 8 (Citado 28 de Julio del 2015). Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53_n3/pdf/a04v53n3.pdf
9. Fernández F. Nanoemulsiones de nistatina para el tratamiento de la candidiasis mucocutánea. Tesis de grado. Facultad de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Barcelona. 2012. (Citado 28 de Julio del 2015). Disponible en http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/83638/FFC_TESIS.pdf?sequence=1
10. Suwanmanee S, Kitisin T, Luplertlop N. In Vitro Screening of 10 Edible Thai Plants for Potential Antifungal Properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014: ID 138587:7. (Citado 16 de Abril del 2015). Disponible en <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/138587/>
11. Ortega C, Estivalet T, Baezab L, Mirandac N, Vataru C, Garcia D, et al. Evaluation of antifungal activity of extracts of *Piper regnellii* obtained by supercritical fluid extraction. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters 2013; 27 (24), (Citado 18 de Abril del 2015). Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2013.830215>
12. Ali I, Khan F, Suri K, Gupta B, Satti N, Dutt P, Afrin F, et al. In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper sp.* 2010, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 9:7. (Citado 2 de Abril del 2015). Disponible en: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/9/1/7>
13. Flores E, Jiménez A, Ravelo A, Bourdy G, Giménez A, Estudio Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida

- in vitro. BIOFARBO. Diciembre de 2000; VIII: 9-14. (Citado 18 de abril del 2015). Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa20000802.pdf>
14. Huamaní M. Ruiz J. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú (tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico) 2005. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.2005. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1278/1/huamani_am.pdf. (LA CONSULTA FUE HECHA: 24/04/2015 A LA 4:00PM)
 15. Romero R. Microbiología y parasitología humana, 3ª ed. México D.F. Editorial Médica Panamericana.2007. (Citado 18 de Abril del 2015). Disponible en; https://books.google.com.pe/books?id=Wv026CUhR6YC&printsec=frontcover&dq=candidiasis+en+piel+pdf&hl=es&sa=X&ei=V3BCVb_nO4yrgwSiz4GIDQ&ved=0CDwQ6AEwBg#v=onepage&q&f=false
 16. Álvarez R. Kuri P. Salud Pública y Medicina Preventiva. 4ª ed. México D.F. Manual Moderno 2012, pp 332. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=tXTKCQAAQBAJ&pg=PA332&dq=epidemiologia+de+la+candidiasis&hl=es&sa=X&ved=0CCkQ6AEwAzgUahUKEwihsdDMio3HAhVEdR4KHSe6Cdo#v=onepage&q=epidemiologia%20de%20la%20candidiasis&f=false>
 17. Katz J, Patel C, Kamram M. Manual Parkland de diagnóstico y tratamiento. Manual Moderno 2009, pp 340. (Citado 28 de Julio del 2015) Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=CljHCQAAQBAJ&pg=PA340&dq=factores+de+riesgo+de+candidiasis&hl=es&sa=X&ved=0CBoQ6AEwADgKahUKEwj717bUko3HAhUFJh4KHfN6APM#v=onepage&q=factores%20de%20riesgo%20de%20candidiasis&f=false>
 18. Inkaplus. Medicina alternativa: Matico Perú. 2013 Disponible en: <http://www.inkaplus.com/media/web/pdf/Matico.pdf>
 19. Tovar O. Plantas medicinales del Valle del Mantaro. Lima CONCYTEC, 2001. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=Qw0fAQAIAAJ&q=caracteristicas+del+%22matico%22+piper&dq=caracteristicas+del+>

%22matico%22+piper&hl=es&sa=X&ei=rxcrVdniFuLLsASmhICQBg&ved=0CD
EQ6AEwBQ

20. Lopera G, Gomes L, Henao I. Fabio H. El milagro de las plantas: aplicaciones medicinales y orofaríngeas: manual. Fundación hogares juveniles campesinos. Bogotá. 2005.(Citado 11 de Abril del 2015) Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=ss3tcgKqh_UC&pg=PT79&dq=Piper+angustifolium&hl=es&sa=X&ei=MF9CVa2IMcKzggTWk4DoBw&ved=0CB4Q6AEwAA#v=onepage&q=Piper%20angustifolium&f=false
21. Wolff K, Goldsmith M, Katz S, Gilchrest R, Paller L, Leffell P, Fitzpatrick. Dermatologia En Medicina General. 7ª ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana 2009. (citado 16 de abril del 2015). Disponible en <https://books.google.com.pe/books?id=1Osiphav6GMC&pg=PA2120&dq=NISTATINA&hl=es&sa=X&ei=H2RCVaDMCMuoNuTOgKAM&ved=0CC0Q6AEwAw#v=onepage&q=NISTATINA&f=false>
22. Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Goodman & Gilman's Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª edición. Buenos Aires. Editorial McGraw-Hill 2011. (Citado 19 de Abril del 2015). Disponible en: <http://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookId=374>
23. Zapata F, Cardona N, Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos Rev CES MEDICINA Enero - Junio / 2012; 26(1): 2-12 <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a07>
24. Mosby. Diccionario Mosby. Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud. 5ª ed. Madrid. Elsevier España. 2013.

ANEXO 1

Tamaño de la muestra

Se consideró un total de 32 placas d Petri, 8 para cada grupo.

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

$$z_{\alpha} = 1.96$$

$$z_{\beta} = 0.84 \quad 7,84$$

$$s^2 = 1,3 \text{ mm}$$

$$X_1 = 19 \text{ mm} \quad \text{según Huamaní M, et al}^{14}$$

$$X_2 = 17 \text{ mm, según Huamaní M, et al}^{14}$$

$$n = 70$$

Se utilizaron 8 muestras para cada uno de los tratamientos.

ANEXO 2

Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas De *Candida albicans* comparada con la Nistatina in vitro.

SENSIBILIDAD A CANDIDA ALBICANS														
CONTROL Y DILUCIONES	PLACAS DE PETRI	CMI mm/ 24 HORAS				CMI mm 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
NISTATINA CONTROL DE CALIDAD	PLACA 1	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	
	PLACA 2	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	
	PLACA 3	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	
	PLACA 4	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	
	PLACA 5	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	
	PLACA 6	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	
	PLACA 7	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	
	PLACA 8	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS				
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	

SENSIBILIDAD A <i>CANDIDA ALBICANS</i>													
CONTROL Y DILUCIONES	PLACAS DE PETRI	CMI mm/ 24 HORAS				CMI mm 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
CONCENTRADO 8%	PLACA 1	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 2	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 3	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 4	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 5	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 6	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 7	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 8	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4

SENSIBILIDAD A CANDIDA ALBICANS													
CONCENTRA DO 10 %	PLACA 1	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 2	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 3	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 4	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 5	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 6	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 7	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 8	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
CONCENTRA DO 12 %	PLACA 1	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4

[illegible]

ANEXO 3

Resultado del Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas De *Candida albicans* comparada con la Nistatina in vitro.

SENSIBILIDAD A <i>CANDIDA ALBICANS</i>													
CONTROL Y DILUCIONES	PLACAS DE PETRI	CMI mm/ 24 HORAS				CMI mm 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
NISTATINA CONTROL DE CALIDAD	PLACA 1	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		26	27	28	25	8	8	9	7	8	7	9	7
	PLACA 2	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 3	27	26	25	28	8	8	7	9	8	8	7	7
		CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
	PLACA 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		27	25	26	26	9	8	8	8	9	8	7	7
	PLACA 5	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 6	25	27	26	26	7	9	8	8	7	9	8	8
		CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
	PLACA 7	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		28	25	25	26	10	9	9	9	9	9	9	7
	PLACA 8	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 9	28	26	28	28	10	9	10	9	10	9	9	7
		CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
	PLACA 10	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		27	26	28	27	10	9	9	10	8	8	9	9
	PLACA 11	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
	PLACA 12	28	26	27	28	10	9	8	10	9	7	7	9

CONCENTRADO 8%	PLACA 1	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		9	9	10	10	9	8	9	8	8	8	7	7
	PLACA 2	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		8	9	10	10	8	8	9	9	8	7	9	7
	PLACA 3	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		10	7	8	8	9	7	8	8	9	7	8	7
	PLACA 4	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		9	9	10	9	9	8	8	8	8	8	7	7
	PLACA 5	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		9	9	8	9	9	8	8	8	8	9	8	7
	PLACA 6	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		13	12	8	8	10	9	8	8	9	9	8	7
	PLACA 7	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		10	8	9	10	9	8	8	9	8	8	7	8
	PLACA 8	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		8	9	10	7	8	8	9	7	7	8	8	7

CONCENTRADO 10 %	PLACA 1	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		17	17	15	15	8	8	7	7	8	8	7	7
	PLACA 2	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		19	15	16	15	9	7	7	7	8	7	7	7
	PLACA 3	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		18	15	16	19	11	11	13	12	13	8	11	11
	PLACA 4	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		19	17	16	16	10	9	8	8	8	9	8	7
	PLACA 5	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		18	17	17	16	9	8	8	8	9	7	8	7
	PLACA 6	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		19	17	18	17	9	8	9	8	9	8	8	7
	PLACA 7	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		19	17	16	16	9	8	7	8	8	7	7	7
	PLACA 8	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		18	19	17	16	9	10	9	8	8	9	8	7

CONCENTRADO 12 %	PLACA 1	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		25	24	25	25	12	12	13	13	11	10	9	11
	PLACA 2	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		24	24	25	26	11	12	12	13	10	9	8	9
	PLACA 3	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		25	24	27	28	11	11	12	12	10	8	11	11
	PLACA 4	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		24	26	28	27	12	11	13	12	11	9	8	9
	PLACA 5	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		25	25	27	28	11	12	13	12	10	9	8	8
	PLACA 6	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		27	26	26	28	13	11	11	13	11	10	9	9
	PLACA 7	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		24	27	25	26	11	13	12	11	10	10	11	10
	PLACA 8	CMI mm / 24 HORAS				CMI mm / 48 HORAS				CMI mm / 72 HORAS			
		DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4	DISCO 1	DISCO 2	DISCO 3	DISCO 4
		26	27	28	25	12	12	13	11	8	7	8	10

ANEXO 4

ACTIVIDAD REALIZADA

Estabilización, acondicionamiento y lavado de las hojas de matico





ADICION DE LAS MUESTRAS E INCUBACION DE LAS PLACAS

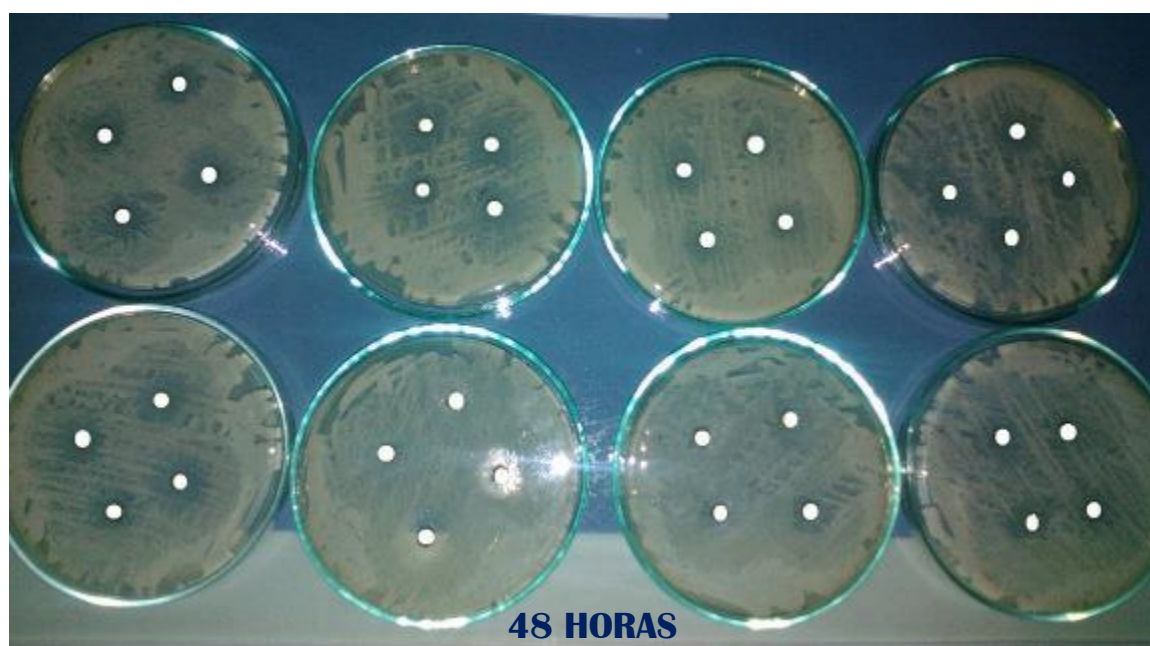
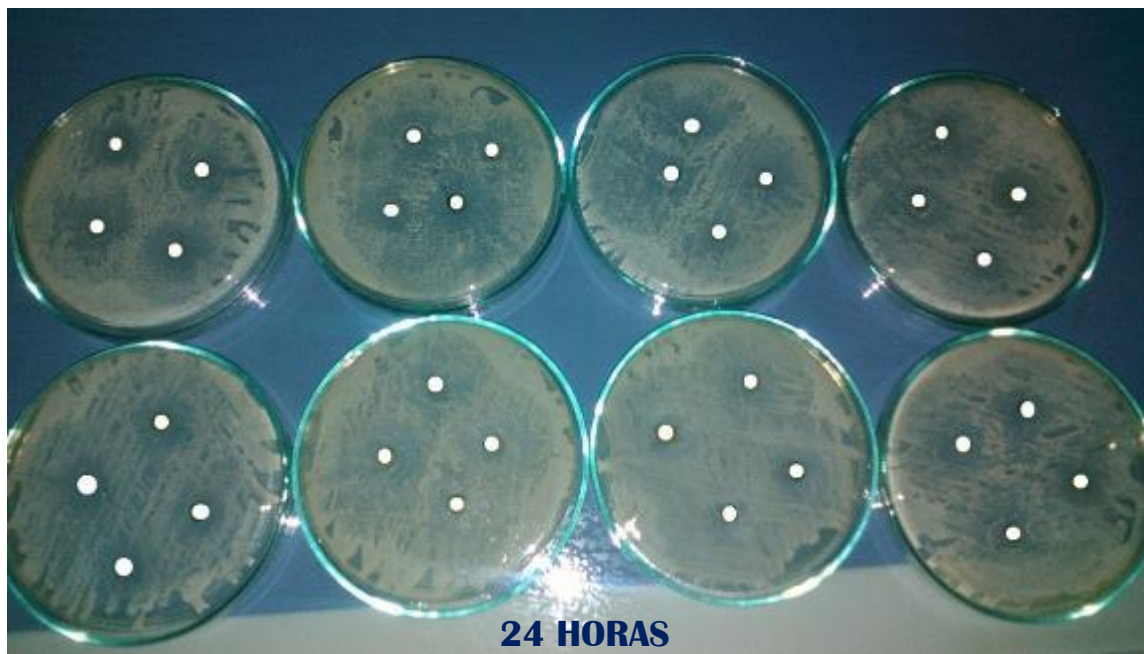


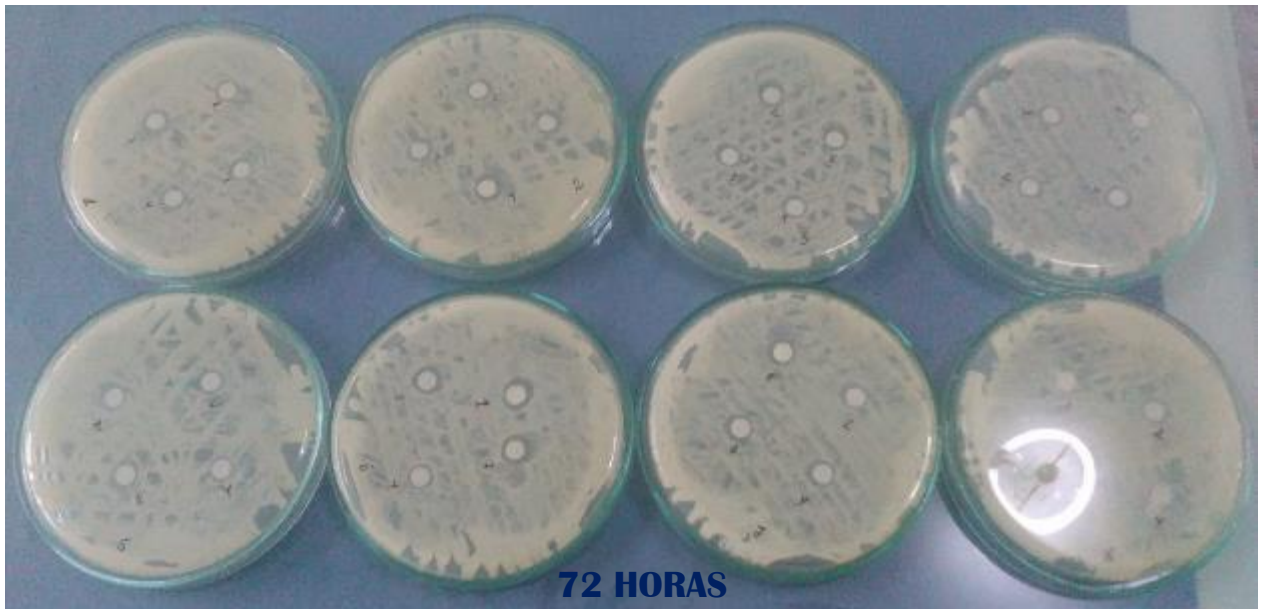


ANEXO 5

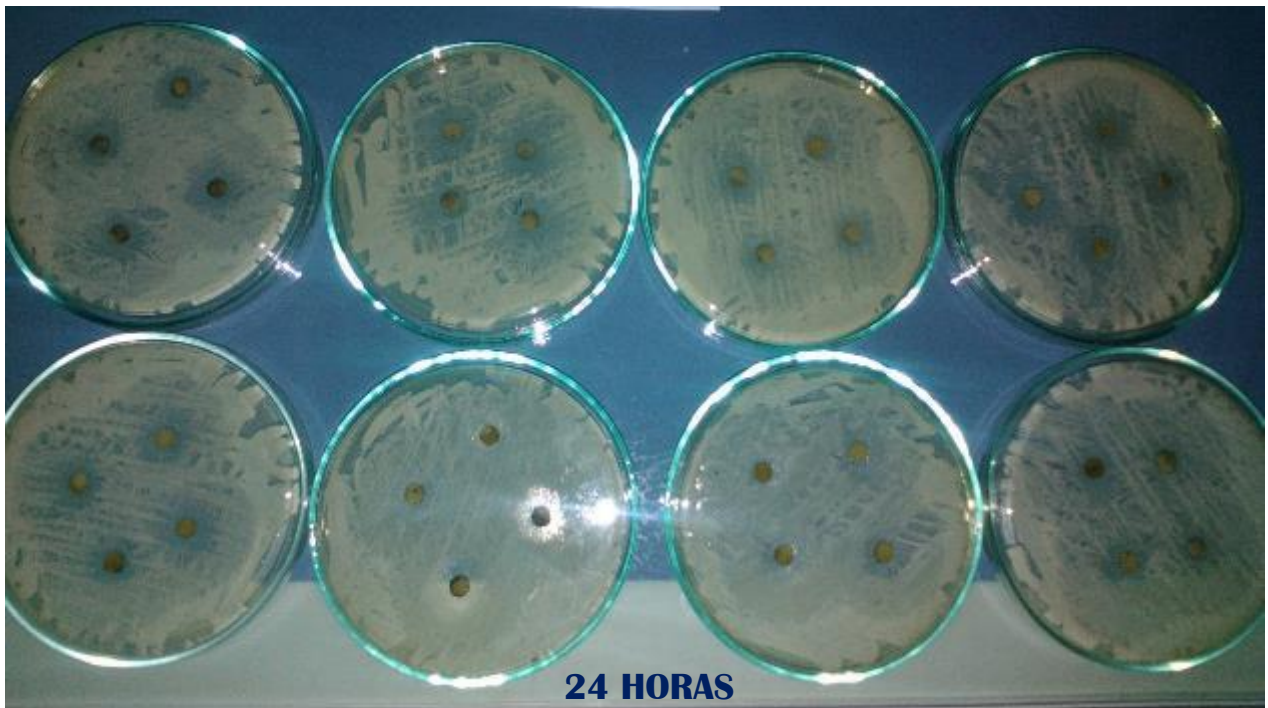
CONTROLES DE RESULTADOS

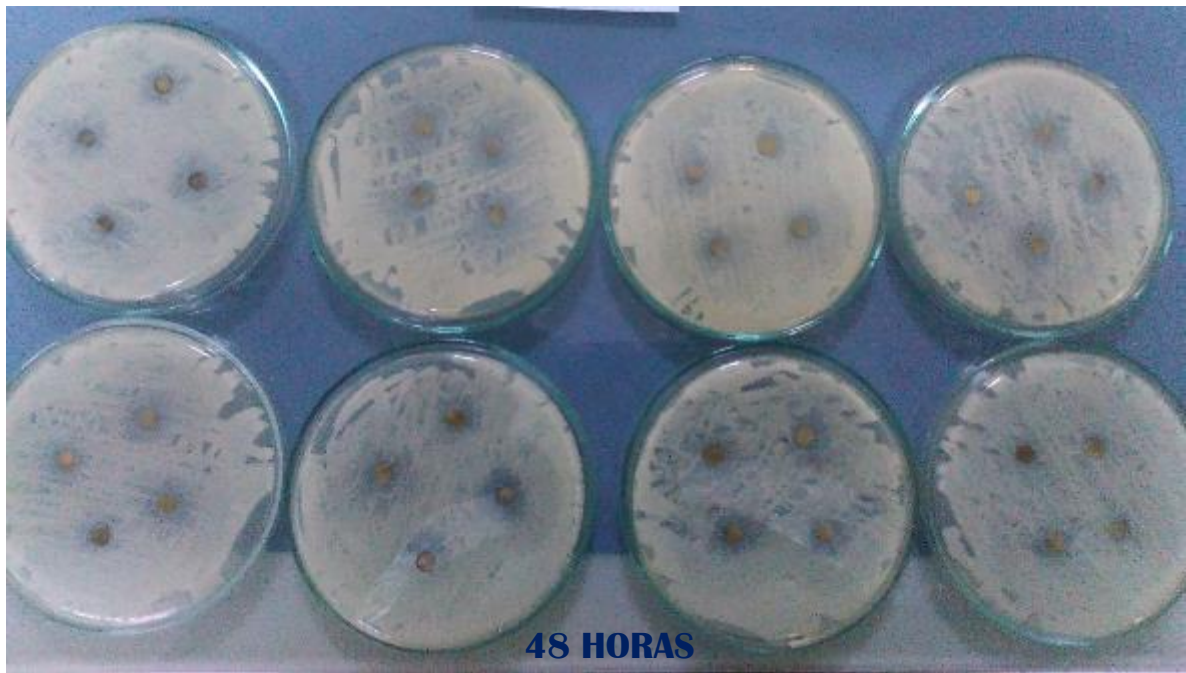
Efecto antifúngico de la nistatina sobre las colonias de *Candida albicans* según días de experimentación. A las 24, 48 y 72 horas de experimentación



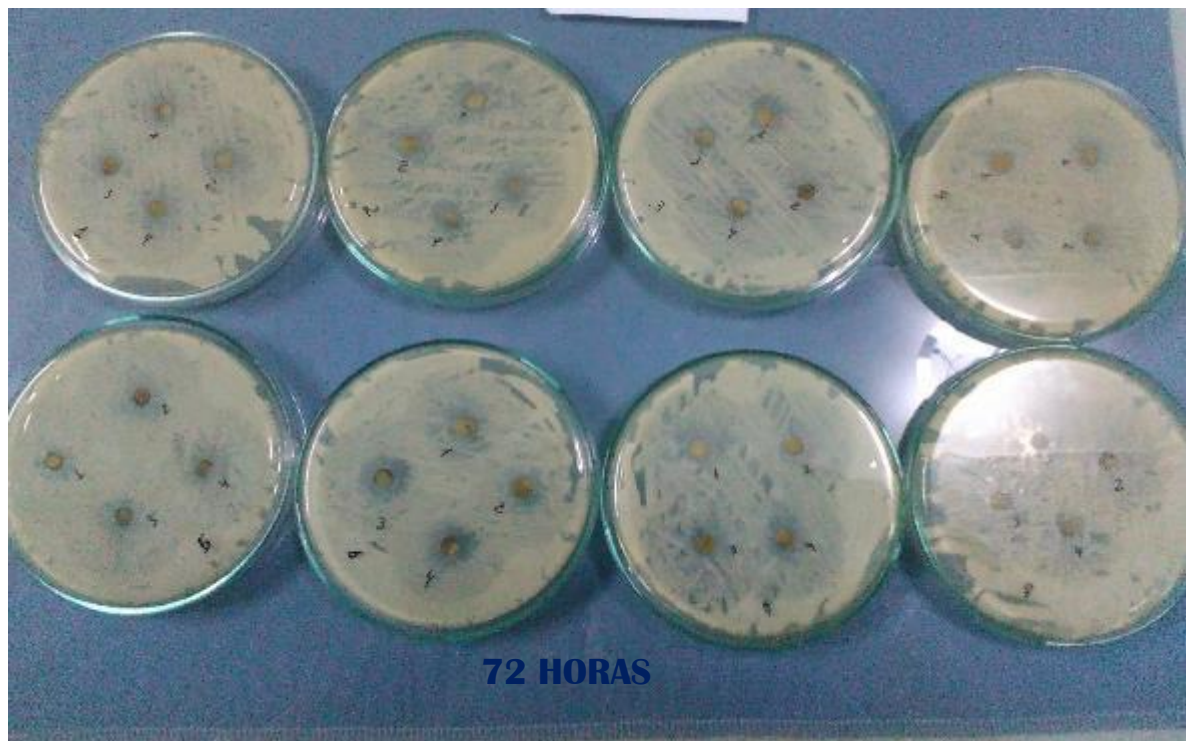


Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* al 8% sobre las colonias de *Candida albicans*, a las 24, 48 y 72 horas de experimentación.



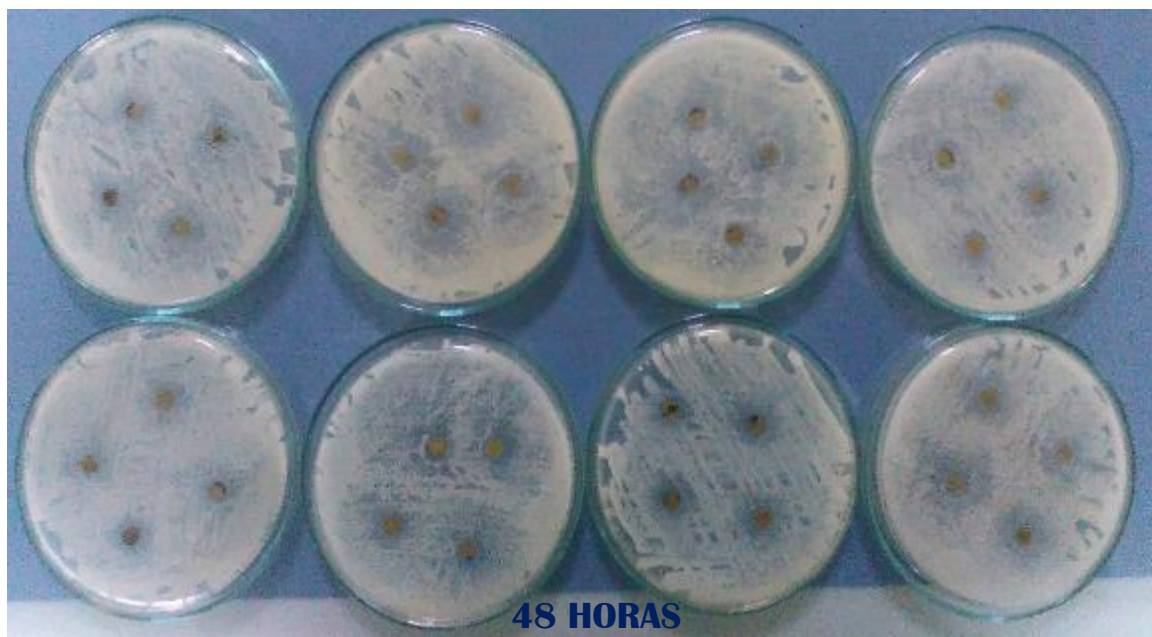
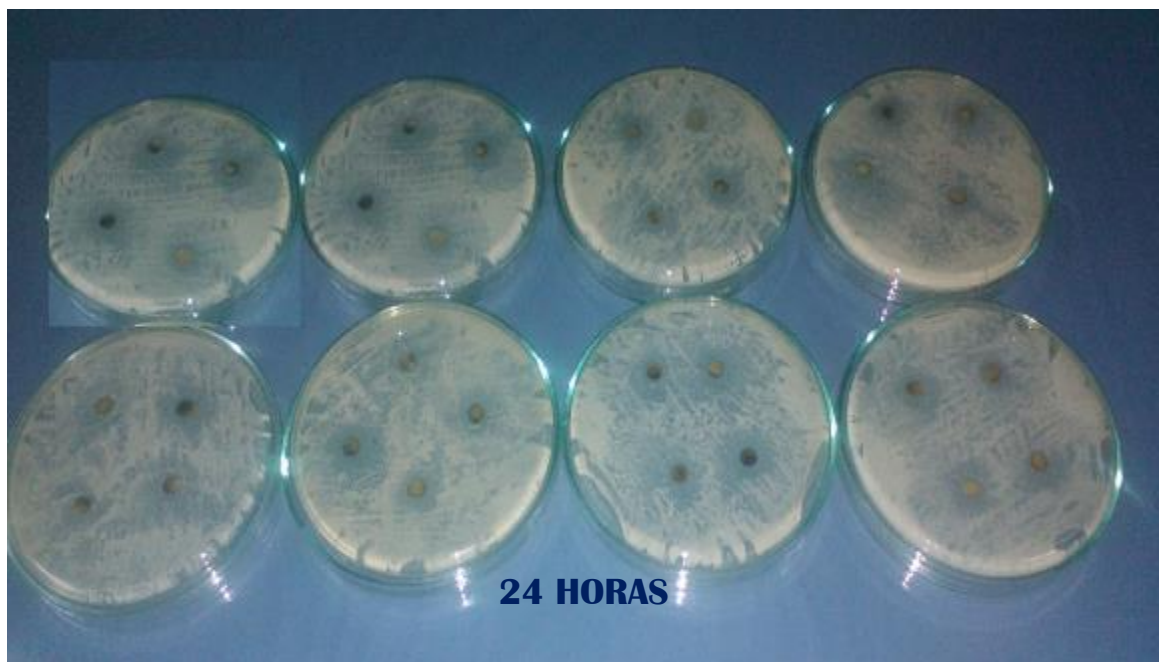


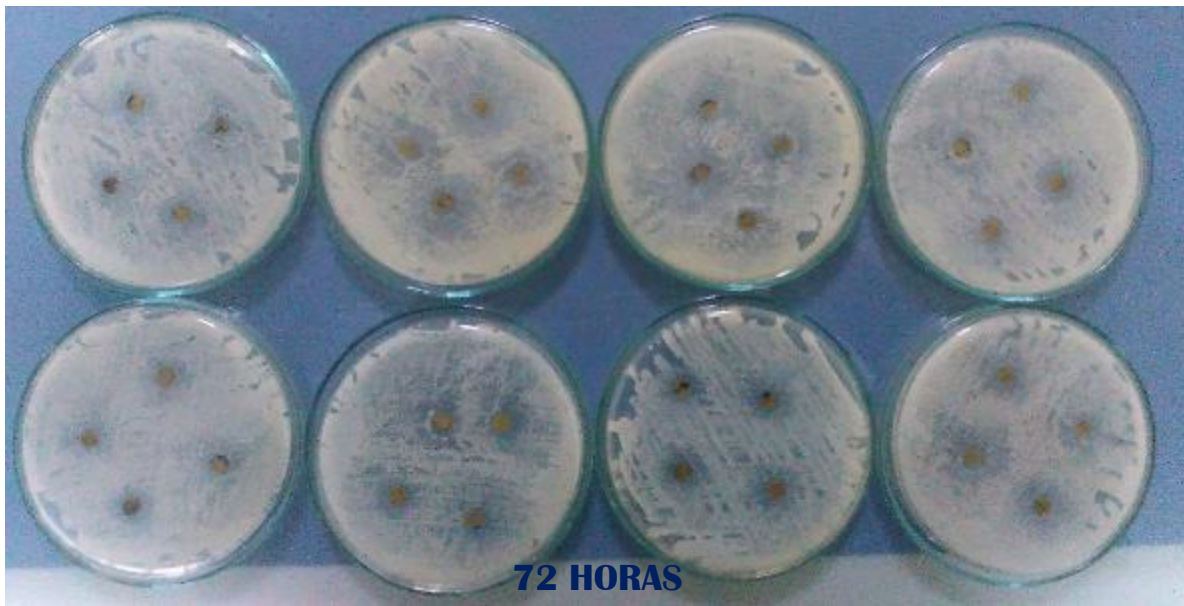
48 HORAS



72 HORAS

Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* al 10% sobre las colonias de *Candida albicans*, a las 24, 48 y 72 horas de experimentación.





Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* al 12% sobre las colonias de *Candida albicans*, a las 24, 48 y 72 horas de experimentación.

